



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **63148985 A**(43) Date of publication of application: **21.06.88**

(51) Int. Cl

C12N 9/62**A23L 1/326****//(C12N 9/62 , C12R 1:66)**(21) Application number: **61296626**(22) Date of filing: **15.12.88**(71) Applicant: **JAPANESE RES & DEV ASSOC
BIO REACTOR SYST FOOD IND**(72) Inventor: **UENO SHIGENORI
MIYANO HITOSHI
MIYAMA AKIRA
OHASHI YOSHITAMI
IZUMIYA SHOICHI
MATAHIRA YOSHIHARU****(54) PRODUCTION OF ENZYME FOR HYDROLYZING
PROTEIN OF FISHES****(57) Abstract:**

PURPOSE: To efficiently obtain protease capable of exhibiting high treating effects in hydrolytically treating proteins of fishes, by cultivating a novel microorganism belonging to the genus *Aspergillus* or variant strain thereof in a nutrient culture medium.

CONSTITUTION: *Aspergillus sojae* S297 (FERM-P No.9073) separated from a commercially available mold starter for soy sauce or a natural or artificial variant

strain thereof is inoculated into a solid culture medium, e.g. wheat bran, etc., then aerobically cultivated for 40V55hr to secrete protease in the culture medium (bran). After the cultivation, the bran is suspended in water to readily migrate the protease into an aqueous layer and remove insoluble substances. Thereby a crude enzymic solution is obtained. Purified protease is prepared from the crude enzymic solution by a normal purification means and utilized for hydrolytically treating proteins of fishes.

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-148985

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)6月21日

C 12 N 9/62
 A 23 L 1/326
 //(C 12 N 9/62
 C 12 R 1:66)

8717-4B
 6840-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 魚類蛋白質分解用酵素の製造法

⑯ 特 願 昭61-296626

⑰ 出 願 昭61(1986)12月15日

⑱ 発 明 者 上 野 茂 典 神奈川県足柄上郡大井町金手280
 ⑱ 発 明 者 宮 野 等 神奈川県足柄上郡大井町金手280
 ⑱ 発 明 者 三 山 亮 神奈川県厚木市栄町110-4
 ⑱ 発 明 者 大 橋 良 民 神奈川県秦野市南が丘2-2-8-303
 ⑱ 発 明 者 和 泉 屋 正 一 神奈川県海老名市さつき町1-10-702
 ⑱ 発 明 者 又 平 芳 春 静岡県島田市東町1510-2
 ⑲ 出 願 人 食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合 東京都中央区日本橋小伝馬町17番17号 峰澤金物ビル4階
 ⑳ 代 理 人 わかもと製薬株式会社

明 細 書

1. 発明の名称

魚類蛋白質分解用酵素の製造法

2. 特許請求の範囲

アスペルギルス・ソエー (Aspergillus sojae) S 297 (微工研菌寄第9073号) 又はその変異株を培養し培地中にプロテアーゼを生成蓄積させ、これを採取することを特徴とする魚類蛋白質分解用酵素の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(1) 産業上の利用分野

本発明は、新規微生物 (アスペルギルス・ソエー S 297) を利用する魚類蛋白質分解用酵素の製造法に関するものである。

カツオやマグロ等の缶詰製造時に副生する煮汁は年間約10万トンあり、この煮汁は蛋白質を多量に含んでいるため、プロテアーゼ処理、その他種々加工されて、微生物培地成分や調味料の素材として利用されている。

しかしながら、魚特有の異臭を消し、旨味・風

味の豊かな加工品を工業的に製造することは非常に困難であるため、実際に利用されている煮汁は約60%に止まり、残りの40%は廃棄されているのが現状である。

本発明は、これら魚類蛋白質を処理するに適した酵素を製造する方法に関するものであり、本発明の酵素は従来市販されているいずれの酵素と比較してもはるかに高い処理効果を示すものである。

(2) 従来の技術

魚類蛋白質を蛋白質源として酵素で加水分解し飲料、調味料および治療食等の素材を得る例は古くから見られる (東海水研報第43巻、87-90頁、1965年; 東海水研報第73巻、103-112頁、1973年)。新しくは、市販アルカリ性プロテアーゼをそれらの活性至適pH域であるpH 7.5-9.0で魚類蛋白質に作用させ、加水分解の程度を15-25%の範囲で停止することにより、不快味が少なくしかも魚臭の少ない加水分解物およびその製造法が発表されている (特開昭61-28370号)。

また、藤巻正生等はストレプトマイセス・グリセウスの産生する酵素、アクチナーゼが魚類蛋白質の分解に通していることを報告している。(アグリカルチャー・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第37巻、2891-2898頁、1973年)

しかしながら、これら従来の方法は、かならずしも満足出来るものではない。

(3) 発明が解決しようとする問題点

本発明はカツオやマグロ等の缶詰製造時あるいはサバやイワシの加工時に多量副生する煮汁等に含まれる魚類蛋白質を処理し、魚特有の異臭を消し、旨味や風味の優れた加工食品にするために使用する酵素が市販品ではかならずしも満足出来ないで、この目的に合致する新規な秀れた酵素を創製することを目的とするものである。

本発明者等は、独自に分離した種々のプロテアーゼ産生菌を培養して得た酵素と市販のプロテアーゼについて、魚類蛋白質分解効果を比較し、本発明者等が分離した菌株アスペルギルス・ソエー S 297 の産生するプロテアーゼが最も秀れている

ことを見出し、本発明を完成した。

(4) 発明の構成

本発明は、「アスペルギルス・ソエー (Aspergillus sojae) S 297 (微工研菌寄第9073号) 又はその変異株を培養し培地中にプロテアーゼを生成蓄積させ、これを採取することを特徴とする魚類蛋白質分解用酵素の製造法。」に関するものである。

(微生物学的特徴)

本発明に係る微生物、アスペルギルス・ソエー S 297 は本発明者等が市販のショウユ用種菌から分離した新規菌株であり、後述する通り、魚類蛋白質分解用酵素として非常にすぐれたプロテアーゼを産生し、分生子柄が極めて短かく、豊富な分生子頭を速やかに形成する点で他のアスペルギルス・ソエーと区別される。

以下、アスペルギルス・ソエー S 297 の菌学的性状をツアベック寒天平板上、25℃で生育させて観察した結果に基づいて説明する。

(生育)

ツアベック寒天平板上では速く広がりコロニー直径は7cm前後に発達する、基底菌糸層は白色で密、分生子柄は極めて短かく、中心部はほとんど羊毛状に盛り上がる事がなく、表面は平坦である。分生子頭と分生子の形成は特に良好で、集落は若い時期が輝黄色～黄色、後に黄緑色～緑色、成熟すると黄褐色、古くなると黄緑色を若干含む褐色となる。集落表面はクリーム色～明淡褐色。

(形態)

分生子頭：直径350～400μm、若いと放射状、成熟するとゆるい放射状、黄緑色～褐色。

分生子柄：長さ200～500μm、直径は頂のう下部で10～13μm、基底菌糸近くが4～7μm、壁表面は平滑であり、頂のうの下部附近だけが粗面。

頂のう：直径20～22μm、亜球形。

フィアライド：頂のうのほぼ前面より形成され、長さ(7～9μm)×幅(3～4μm)

分生子：直径5～6.3μm、球形～亜球形、表

面が刺状 (coarsely echinulate)。

菌核：形成されない。

その他：p-アニスアルデヒド含有ツアベック寒天平板上でピンク色素の形成能無し。コウジ酸を産生する。アフラトキシンB₁、B₂、G₁、G₂を産生しない。

以上の菌学的性状をケイ・ビー・ラバー・アンド・ディー・アイ・フェンネル (K. B. Raper & D. I. Fennell) 著、ザ・ジーナス・アスペルギルス (The Genus Aspergillus)、375-403頁、1965年；エス・ウシジマ (S. Ushijima) 等、アグリカルチャー・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry) 第46巻、2365-2367頁、1982年；エッチ・ムラカミ (H. Murakami) 等、ジャーナル・オブ・ジェネラル・アンド・アプライド・ミクロバイオロジー (Journal of General and Applied Microbiology) 第28巻、55-60頁、1982年の文献に基づいて検討し、本発明のS 297株はアスペルギルス・ソエー (Aspergillus Sojae) に属する菌株である

ことを確認した。

本発明に利用出来る微生物は、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第9073号として寄託されているアスペルギルス・ソエーS 297 菌株のみに止まらず、その自然的又は人口の変異株も当然包含される。

本発明に於ける培養は、液体培養でもよいが、一般的には、好氣的固体培養の方が好ましい。

通常、本発明の菌株S 297 は小麦穀等の固体培地に接種し、40～55時間好氣的に培養するとプロテアーゼを培地（麹）に分泌する。培養後、麹を水に懸濁することによりプロテアーゼは容易に水層中に移行し、不溶物を除去することにより粗酵素液を得ることが出来る。

この粗酵素液から、公知の酵素精製法により、精製プロテアーゼを得ることが出来る。

以下、実施例により本発明の実施態様を詳細に説明する。

実施例

大麦 4.8 kg、 KH_2PO_4 320 g、L-グルタミン酸

ナトリウム 160 g、水 8 ℓ からなる固体培地を 121℃、1 気圧下 20 分間滅菌した後、アスペルギルス・ソエーS 297 の分生子を植菌し、30℃で2日間通風培養し、麹 6.9 kg を得た。これを水 60 ℓ 中に懸濁させ充分攪拌後遠心分離（9000 rpm）し、上清液 55 ℓ（酵素力価 220 U/ℓ）を得た。次いで、この液をホロファイバースシステム（小松川化工機製）により分離膜PM1000を通して後、分離膜PM5 で濃縮し、精製回収した。

得られた濃縮液は 4 ℓ で、280 nm の吸光度が 26 であった。

この液に安定剤として 420 g のデキストリン（日本窒素工業社製 NSD1318）を加えた後、凍結乾燥を行い、422 g の酵素粉末を得た。

酵素力価は 24000 U/g であり、回収率は 83.7 % であった。

この酵素粉末は本発明酵素の標品として以後の試験に供した。

（酵素学的特徴）

この標品酵素は、単一のプロテアーゼからなる

ものではなく、多種類のプロテアーゼの混合物から構成されている。このことを明らかにするため、その中に含まれる比較的強い活性を示したプロテアーゼ 6 種について、酵素活性を測定した結果を第 1 表に示す。

第 1 表

標品酵素中の プロテアーゼ	力 価 単位/mg 蛋白	検定した活性測定法			文獻・
		基 質	pH		
アルカリ性及び 中性プロテイナーゼ	260	ミルックカゼイン	7.0	①	
酸性プロテイナーゼ	24	ミルックカゼイン	3.0	②	
酸性カルボキシン ペプチダーゼ I	0.04	カルボベンゾキシー アラニル-グルタミン酸	4.0	③	
酸性カルボキシン ペプチダーゼ II	0.08	カルボベンゾキシー グルタミル-チロシン	3.0	④	
ロイシンアミノ ペプチダーゼ	0.08	L-ロイシル-L-プロ ジエチルアミノアニリド	8.0	⑤	

* 文献

- ①: Agricultural and Biological Chemistry 37, 3685(1973).
 ②: Method of Enzymology, G. E. Perlmann and L. Lorand, Academic Press, 18, 397 (1970).
 ③: Biochemica et Biophysica Acta 397, 443(1975).
 ④: 和光純薬工業特製 LAP・C-Test Wako 使用の活性測定法。

本発明酵素は第1表に示すように多種類の酵素を含んでおり、それら個々の酵素を分離して使用することも出来るが、通常、混合物のままで使用して好適な結果を得ることが出来る。

本発明酵素により魚類蛋白質を分解処理する場合、酵素は不活性担体に固定化して使用することも出来る。

この分解処理は50～60℃で行なわれる場合が多いが、本発明酵素は、市販酵素に比較して耐熱性が秀れているので実際の使用場面で好適な処

理効果を得ることが出来る。

次に市販の代表的プロテアーゼと本発明酵素の耐熱性試験結果を第2表に示す。

第2表

供試酵素	残 存 活 性 率 (%)		
	中性及びアルカリ性 プロテイナーゼ	カルボキシ ペプチダーゼ	アミノペプチ ダーゼ
本発明酵素	19.9	87.5	17
プロテアーゼP	2.5	4.0	78
パンチダーゼNP-2	4.7	73.2	64
プロチン FN	7.2	60.1	65
プロテアーゼA	4.2	69.6	18

* 残存活性率は、各供試酵素について、その中に含まれる表記3種の酵素活性を次の方法により測定して求めた。

(イ) 中性及びアルカリ性プロテイナーゼの活性は20mMリン酸バッファー (pH7.0) 中で酵素を60℃、10分間処理して残存する活性をアンソン-萩原改変法で測定した。

(ロ) カルボキシペプチダーゼの活性は20mMリン酸バッファー (pH6.0) 中で酵素を50℃、10分間処理して残存する活性を中田等の方法 (Agricultural and Biological Chemistry, 36, 1343(1972)) に準じ基質カルボベンゾキシンググルタミン-チロシンを使用して測定した。

(ハ) アミノペプチダーゼの活性は20mMリン酸バッファー (pH7.0) 中で酵素を60℃、10分間処理して残存する活性をLAP C-Test Wako (和光純薬製) を用いて測定した。

第2表の成績から明らかなように、本発明酵素は、魚蛋白質の分解に直接関与すると思われる中

性及びアルカリ性プロテイナーゼとカルボキシペプチダーゼの耐熱性が市販酵素に比較して著しく優れていた。

5 作用効果

本発明酵素の作用効果を説明するため、以下に試験例を示す。

試験例 1

本発明酵素及び市販酵素で処理して得られる魚類蛋白質分解産物の味に関する官能検査。

試験方法

カルチベーター 350 (マグロ缶詰製造時に副生する煮汁エキスの商品名、焼津水産化学工業株式会社製、水分 40%) を基質とし、供試プロテアーゼを 20 単位 / ml の割合になるように添加し、50℃、3 時間加水分解処理した。処理液を 5 分間煮沸した後、水で 2 倍希釈したものについて、60℃で専門家 8 名により、旨味が強く苦味が少ないことを総合的に評価して順位法 (日科技連官能検査委員会編、官能検査ハンドブック) により官能検査した。

第 3 表の試験結果から明らかなように、本発明酵素で処理した煮汁エキ스는最も良い評点を得ており、いずれの市販酵素を用いて処理した煮汁エキスよりも官能的に優れたものを与えることが判明した。

供試酵素

酵素名	製造会社	起 源
プロテアーゼ P	天野製薬	アスペルギルス・ネリウス
パンチダーゼ NP-2	ヤクルト本社	アスペルギルス・オリゼー
アクチナーゼ	科研製薬	ストレプトマイセス・グリセウス
本発明酵素		アスペルギルス・ソエー

試験結果

本試験の結果は第 3 表に示す。

第 3 表

供試酵素**	評点	有意差 (5%) *
プロテアーゼ P	17	な し
パンチダーゼ NP-2	28	な し
アクチナーゼ	23	な し
本発明酵素	12	あ り

*有意差検定はクレマーの迅速有意差検定表

(官能検査ハンドブック 845 頁) により行った。

**供試酵素中の市販酵素は、第 4 表に示す市販酵素 25 品目について、試験例 1 と同様な官能試験を行い、上位 3 品目を選んだものである。

第 4 表

酵 素 名	製造会社	起 源
プロテアーゼ YPSS	ヤクルト本社	Aspergillus niger
プロチン P-A	大 和 化 成	A. niger
プロテアーゼ Type X IX	米国シグマ社	A. sojae
プロチン P-N	大 和 化 成	A. oryzae
パンチダーゼ NP-2	ヤクルト本社	A. oryzae
デナチーム AP	長 州 産 業	A. oryzae
プロテアーゼ H	天 野 製 薬	A. oryzae
プロテアーゼ A	天 野 製 薬	A. oryzae
プロテアーゼ P	天 野 製 薬	A. nellerus
モルシン	盛 進 製 薬	A. saitoi
デナブシン 2P	ナガセ生化学工業	A. species
ニューラーゼ F	天 野 製 薬	Rhizopus niveus
アクチナーゼ	科 研 製 薬	Streptomyces griseus
アロアーゼ AP-10	ヤクルト本社	Bacillus subtilis
スクレイシン	田 辺 製 薬	B. subtilis
ヒオブラーゼ	ナガセ生化学工業	B. subtilis
プロチン AC-10P	大 和 化 成	B. subtilis
プロチン PC-10P	大 和 化 成	B. subtilis
プロテアーゼ N	天 野 製 薬	B. subtilis
サモアーゼ PC-10P	大 和 化 成	B. thermoproteolyticus
アロレザー	天 野 製 薬	B. species
トリブシン Type II (Crude)	米国シグマ社	牛肝臓
パンクレアチン	天 野 製 薬	動物肝臓
カルボキシペプチダーゼ	ペ ン テ ル	小 麦
パバイン	ナガセ生化学工業	パパイヤ

試験例 2

本発明酵素及び公知のアスペルギルス・ソエー菌産生のプロテアーゼで処理して得られる魚類蛋白質分解産物の味に関する官能検査。

試験方法

魚類蛋白質分解産物の調製は試験例 1 と同様に行い、官能検査は専門家 9 名により供試酵素とプロテアーゼ P (試験例 1 で、市販酵素の中で最も官能的に好ましい分解物を与えた酵素) との間で味を比較する 2 点嗜好試験法 (官能検査ハンドブック参照) で行った。

供試酵素

本発明酵素と、比較的耐熱性の良いプロテアーゼを産生することの知られている食糧研究所保存のアスペルギルス・ソエーに属する菌株 8 種 (保存番号: R1921 II, R1921 III, R6110 II, R1312 V, R6423 II, S-12-3, O-14-9 II, O-20-2) を選び前記実施例と同様にしてそれぞれの菌を培養し供試酵素を調製した。

試験

試験方法

カルチベーター 350 (前記、マグロ煮汁エキスをアンバーライト IR-120B (H⁺ 形) カラムに通液し、その中に含まれている遊離のアミノ酸を吸着除去し、A260nm/A280nm 比が 1.5 以下の面分を集め、pH 6.0 に調製した後凍結乾燥して基質として用いる魚蛋白質を調製した。

この魚蛋白質 5.6 % (w/v) 水溶液に供試酵素を 100 U / ml (アンソン-萩原改変法で求めた力価) の割合で添加し、50℃、10 分間加水分解反応を行い、生成した α-アミノ基を TNBS 法 (奥山典五, 笠井久隆著、蛋白質・核酸・酵素第 18 巻、1153-1159 頁、1973 年) に従って測定し、魚蛋白質分解率を次の式から算出した。

魚蛋白質分解率 =

$$\frac{(\text{基質} \cdot \text{酵素反応物}) - (\text{基質}) - (\text{酵素})}{(\text{基質の KOH 分解物}) - (\text{基質})} \times 100$$

(但し、式中 () は () 内の物の α-アミノ

試験結果

本試験の結果は第 5 表に示す。

第 5 表

供試酵素	「好ましい」と判断した パネラー数	
	供試酵素	プロテアーゼ P
本発明酵素	8 名	1 名
R1921 II 起源	4	5
R1921 III "	3	6
R6110 II "	5	4
R1312 V "	4	5
R6423 II "	4	5
S-12-3 "	7	2
O-14-9 II "	3	6
O-20-2 "	3	6

第 5 表の成績から明らかなように、アスペルギルス・ソエーに属する菌株の産生するプロテアーゼは、市販酵素の中から最も好ましい結果を得たプロテアーゼ P に比較して遜色無いものが多かったが、本発明酵素はそれらの中で抜群の成績を得た。

試験例 3

本発明酵素及び市販酵素の魚類蛋白質分解活性

基の分析値を示す。)

試験結果

本試験の結果は第 6 表に示す。

第 6 表

供試酵素	魚蛋白質分解率 (%)
本発明酵素	25.7
パバイン	8.8
トリプシン typ II (Crude)	13.2
パンチダーゼ NP-2	12.5
プロチン FN	13.4
アクチナーゼ	11.0
プロテアーゼ A	17.0
プロテアーゼ P	10.5

第 6 表の成績が示すように、本発明酵素は市販の魚蛋白質分解に適した酵素及び代表的植物起源及び動物起源のプロテアーゼに比較してはるかに高い魚蛋白質分解率を示した。

なお、本明細書に於いて酵素単位は、特記しない限り、中台らによりアグリカルチャー・アンド・バイオロジカル・ケミストリー第 37 巻、2685-2694 頁、1973 年に報告されたプロテイナーゼ活

昭和61年12月22日

性測定法(アンソン-萩原改変法)により、ミルクカゼイン(メルク社製)を供試酵素で30℃、pH7.0で分解する条件下、1分間当り1μmoleのチロシンを遊離させる酵素量で示した。

特許庁長官 黒 田 明 雄 殿

1. 事件の表示

昭和61年12月15日提出の特許願

2. 発明の名称

魚類蛋白質分解用酵素の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区日本橋小伝馬町17番17
シヨクヒンサンギョウ ギジュツケンキョクミアイ
 名称 食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合

代表者 中 川 越

4. 代 理 人

住所 東京都中央区日本橋室町1丁目8番地
セイ ヤク
 名称 わ か も と 製 菓 株 式 会 社

代表者 村 井 八 郎

5. 補正命令の日付 (自 発)

6. 補正により増加する発明の数



7. 補正の対象

願書の出願人の住所の欄、明細書及び委任状の追完

8. 補正の内容

① 願書の出願人の住所の欄に「小伝馬町17
コデンマチョウ コデンマチョウ ミナトワカサ
 番17」とあるを「小伝馬町17番17号崎澤金
モノ ガイ
 物ビル4階」に補正する。

② 明細書第3頁4行目に「カルチャー」とあるを「カルチュラル」に補正する。

③ 同第6頁12行目に「カルチャー」とあるを「カルチュラル」に補正する。

④ 同第6頁末行に「Sojaa」とあるを「sojaa」に補正する。

⑤ 同第11頁4行目に「Method of」とあるを「Method in」に補正する。

⑥ 同第11頁9行目に「LAP・C」とあるを「LAPC」に補正する。

⑦ 同第18頁下から6行目に「thermoprotealyticas」とあるを「thermoproteolyticus」に補正する。

⑧ 同第22頁8行目に「typ」とあるを「type」に補正する。

⑨ 同第22頁下から3行目に「アグリカルチャー」とあるを「アグリカルチュラル」に補正する。

9. 添附書類の目録

(1) 訂 正 願 書	1 通
(2) 登 記 簿 謄 本	1 通
(3) 委 任 状	1 通